Přímé chromatografické stanovení organických kyselin, vznikajících při tvorbě kyseliny citrónové zkvašováním melasových roztoků plísní *Aspergillus niger*

L. SEICHERT, Biochemický výzkum, Lachema, n. p., závod J. Fučíka Kaznějov u Plzně

664.15
545.844

Velmi důležitým kritériem při posuzování procesu tvorby kyseliny citrónové zkvašováním melasových roztoků plísní *Aspergillus niger* je sledování všech organických kyselin vylučovaných do média. Analytické stanovení těchto kyselin v melasovém prostředí, kdy při použití vysoce produkčních kmenů připadá na množství kyseliny citrónové poměrně malé procento vedlejších kyselin, je krajně obtížné. Existující metody se vyznačují časovou i experimentální náročností a jsou vypracovány pouze pro několik málo kyselin. Nedostatkem je rovněž jejich poměrně malá citlivost.

Používá-li se chromatografické analýzy, izolují se nejdříve kyseliny z média, neboť přítomnost velkého množství ostatních látek, pocházejících z melasy, vedle cukru hlavně barviv, látek koloidních i minerálních, při použití běžné techniky chromatografickou analýzu ruší. Velkou nevýhodou při úpravě vzorků je poměrně značná nešetrnost používaných metod, z nichž žádná není vhodná pro izolaci všech v úvahu přicházejících kyselin. Některé sledované kyseliny se často částečně nebo i úplně rozloží, popř. se zachytí na použitém adsorbens.

Potřeba využít výhod chromatografického sledování vedla k vypracování modifikované metody jednorozměrné chromatografie, umožňující dostatečně citlivou a rychlou chromatografickou analýzu vzorku bez jeho předchozí úpravy.

Experimentální část

Použitá základní technika

Vzorky se nanášejí na chromatografický papír Whatman číslo 3, nejlépe v podobě tečky. Používá se archů rozměrů 62 × 57 cm, umožňujících současnou analýzu 14 až 16 vzorků. Optimální objem nanášeného vzorku při sledování průběhu citrónového kvašení je 12,5 až 25 μ l. Je výhodné nanášet příslušný vzorek vždy v několika objemech současně, neboť poměr mezi vytvořenými kyselinami a ostatními látkami, zejména sacharózou, se v procesu značně mění, a to má vliv na kvalitu dělení.

Vyvíjí se sestupným způsobem v soustavě n-butylná-kyselina mravenčí-voda 10 : 7 : 10, kterou použil při kruhové chromatografii organických kyselin Giri [1]. Soustava se připravuje vždy 16 až 18 hodin před použitím. K vyvíjení se používá vrchní fáze, spodní fáze slouží k sycení komory párami. Vyvíjení probíhá ve velkých komorách z novoduru a skla o rozměrech 680 × 600 × 220 mm. Doba vyvíjení je 8,5 hodin $\pm$ 15 minut. Vzdálenost čela od startu je 46 cm.

Po skončení vyvíjení je chromatogram sušen v proudu teplého vzduchu přibližně 20 hodin, aby vytékala kyselina mravenčí. Detekce se provádí na základě reakce redukcí cukrů s aromatickými aminy na místě skvrny kyseliny, metodou navrženou Smithem a Priestersbachem [2]. Nejlépe se

osvědčil postřik chromatogramu roztokem anilinu a xylózy 1 : 1 v 50% etanolu v koncentraci 5 g na 100 ml roztoku. Po postřiku následuje zahřátí v sušárně při 125 až 130 °C po dobu 5 až 8 minut, ukončení reakce je lépe sledovat. V místech kyselin se objeví hnědé skvrny, které jsou poměrně stálé.

Citlivost uvedené detekční metody je pro sledování i malých množství tvořených kyselin dostatečná, u kyseliny citrónové, jantarové, fumarové, itakonové a glutarové lze odhalit již koncentraci 5 γ , u kyseliny jablečné, adipové, vinné, malonové a citrkonové 10 γ , u kyseliny α -keto-glutarové, glukonové, šťavelové, mléčné, cis-akonitové a galaktonové 15 γ .

Provádění analýzy a dosažené výsledky

Pro bezpečnější identifikaci se zároveň s analyzovanými vzorky nanáší vždy rovněž standardní směs kyselin v melasovém roztoku, popř. se některé standardní kyseliny přidávají ještě do části nanášeného vzorku. Hodnoty R_f jednotlivých kyselin nejsou totiž stálé a mění se podle složení melasového roztoku, který se při kvasném procesu také podstatně mění (klesá obsah cukru, přibývá organických kyselin především kyseliny citrónové, mění se obsah aminokyselin i solí).

Rovněž vlastní vzorek se nanáší v několika objemech. Tím se dosáhne jednak dokonalého dělení při měnícím se složení vzorku, jednak lze předběžně zjistit přibližnou koncentraci sledovaných látek. Osvědčilo se použít čtyř objemů vzorku: 6,25 μ l, 12,5 μ l, 25 μ l a 50 μ l. Podle toho, ve kterém objemu vzorku byla příslušná kyselina poprvé zjištěna, lze pak výpočtem stanovit její přibližné množství v původním vzorku, s výjimkou případů, kdy je její přítomnost zjištěna již v nejnižším naneseném objemu. V těchto případech lze pouze konstatovat její minimální množství.

Z vedlejších kyselin se při citrónovém kvašení tvoří nejčastěji kyselina šťavelová, glukonová a jablečná, méně pak kyselina jantarová a fumarová. V úvahu však přichází i kyselina α -keto-glutarová a cis-akonitová. Při analýzách melasového roztoku se použitou detekční metodou odhalí rovněž některé kyseliny reagující aminokyseliny (obr. 1- n_1 - n_4), které dělení dále komplikují a jsou jednou z hlavních příčin rušení chromatografické analýzy neupravených vzorků. Nejlepšího dělení se při použití popsané modifikované metody dosáhne v přítomnosti kyseliny šťavelové (obr. 1-3). Tato kyselina zůstává až do koncentrace 40 γ v objemu nanášeného vzorku na startu, při zvýšených koncentracích začíná tvořit od startu protáhlé skvrny úměrné rostoucí koncentraci. Při koncentraci kyseliny šťavelové 150 γ se dosáhne optimálního dělení sledovaných kyselin, kyselina šťavelová tvoří intenzivní skvrnu v poloze za kyselinou jablečnou a protažení

Obr. 1. Přímé chromatografické stanovení organických kyselin, vznikajících při tvorbě kyseliny citrónové zkvašováním melasových roztoků plísní *Aspergillus niger*

Soustava: n-butylalkohol-kyselina mravenčí-voda 10 : 7 : 10
1 — Původní vzorek; 2 — přidáno 100 γ H_2SO_4 ; 3 — přítomno 150 γ kys. šťavelové; 4 — přítomno nad 150 γ kys. šťavelové; o — kys. šťavelová; g — kys. glukonová; t — kys. vinná; c — kys. citrónová; m — kys. jablečná; k — kys. α -keto-glutarová; s — kys. jantarová; a — kys. cis-akonitová; f — kys. fumarová; n_1 až n_4 — kyseliny reagující aminokyselinami.

Došlo do redakce 14. 7. 1965.

НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ СБРАЖИВАНИЯ РАСТВОРА МЕЛАСЫ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБКАМИ ASPERGILLUS NIGER

Для определения органических кислот образующихся при производстве лимонной кислоты методом сбраживания раствора меласы плесневыми грибами *Aspergillus niger* был модифицирован метод одномерной бумажной хроматографии, дающий возможность достаточно точного определения с малой затратой времени и без необходимости предварительной, сложной подготовки проб. Определяются следующие кислоты: глюконовая, лимонная, яблочная, щавелевая, keto-глутаровая, янтарная, аконитовая, fumarовая и винная. Метод показывает также приблизительную концентрацию отдельных кислот.

DIREKTE CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER BEI DER ZITRONENSÄUREBILDUNG DURCH VERGÄRUNG DER LÖSUNGEN DER SCHIMMELPILZE ASPERGILLUS NIGER ENTSTEHENDEN ORGANISCHEN SÄUREN

Zur Bestimmung der organischen Säuren, die bei der Zitronensäurebildung durch Vergärung von Melasselösungen der Schimmelpilze *Aspergillus niger* entstehen, wurde eine modifizierte eindimensionale papierchromatographische Methode ausgearbeitet, die eine genügend empfindliche und schnelle Analyse der Proben ohne ihre vorherige Aufbereitung ermöglicht. Mittels dieser Methode können in der Melasselösung nebeneinander die folgenden Säuren bestimmt werden: Glukonsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, α -Ketoglutarsäure, Cis-Akonitsäure, Fumarsäure und Weinsäure. Die Methode dient auch zu der approximativen Bestimmung der Konzentration der erwähnten Säuren.

STRAIGHT CHROMATIGRAPHIC DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS PRODUCED AT PLANTS MANUFACTURING CITRIC ACID BY FERMENTING MOLASSES SOLUTION WITH THE ASPERGILLUS NIGER MOULD

A new method, which can be described as a modified one-dimensional paper chromatography, has been developed to identify organic acids produced at plants manufacturing citric acid by fermenting molasses solution with the *Aspergillus niger* mould. The method is reasonably sensitive, saves much time and requires no special preparation of samples. The following acids can be identified and their concentrations roughly estimated: gluconic, citric, malic, oxalic, keto-glutaric, succinic, cis-aconitic, fumaric and tartaric.

skvrny od startu je natolik potlačeno, že není rušeno dělení ostatních kyselin. Při vyšších koncentracích se již ruší dělení kyselin s vyššími hodnotami R_f (obr. 1—4). V přítomnosti kyseliny šťavelové, která netvoří-li se při kvašení, přidává se do vzorku, lze rozdělit vedle sebe v melasovém médiu kyselinu glukonovou, citrónovou, jablečnou, α -keto-glutarovou, jantarovou, cis-akonitovou a fumarovou a oddělit je od kyseliny reagující aminokyselinami přítomných v melasovém roztoku, popř. lze oddělit i kyselinu vinnou, jejíž přítomnost v melasovém médiu nepřichází však prakticky v úvahu. V případě, kdy detekci ruší přítomnost silně basických látek s nízkými hodnotami R_f , lze zlepšeného dělení dosáhnout přidávkou kyseliny sírové v množství 100 γ do objemu nanášeného vzorku. Rozdělí se další kyseliny reagující látky z melasy, dávající pozitivní reakci s ninhidrinem (obr. 1—2). Použití kyseliny solné se neosvědčilo.

Kvantitativní vyhodnocování se provádí fotometricky. Pro každou kyselinu a příslušné složení média se provedou kalibrační křivky, neboť detekční reakce probíhá u různých kyselin rozdílně. Reprodukovatelných výsledků se dosáhne v rozmezí koncentrace 10 až 200 γ s chybou přibližně 10 %.

Souhrn

Ke stanovení organických kyselin, vznikajících při tvorbě kyseliny citrónové zkvašováním melasových roztoků plísní *Aspergillus niger*, byla vypracována modifikovaná metoda jednorozměrné papírové chromatografie, umožňující dostatečně citlivou a rychlou analýzu vzorku bez jeho předchozí úpravy. Metoda umožňuje stanovit v melasovém roztoku vedle sebe kyseliny: glukonovou, citrónovou, jablečnou, šťavelovou, α -keto-glutarovou, jantarovou, cis-akonitovou, fumarovou a vinnou a zjistit jejich přibližnou koncentraci.

Literatura

- [1] Giri, K. V. - Krishna Murthy, D. V. - Rao, P. L. N.: „J. Indian Inst. Sci.“, 35, 1953 : 93.
- [2] Smith, F.-Spriestersbach, D.: „Nature“, 174, 1954 : 468.